

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang bertujuan untuk mendeskripsikan gejala, peristiwa, maupun kejadian yang terjadi pada saat sekarang (Sudjana & Ibrahim, 1989). Penambatan molekuler dilakukan untuk mengetahui afinitas ikatan dan interaksi molekuler senyawa metabolit yang terkandung pada daging ikan sidat tahap *silver eel* dalam menambat aktivitas *main protease* SARS-CoV-2, *receptor binding domain* (RBD) SARS-CoV-2, dan *Angiotensin-converting Enzyme 2* (ACE2).

### 3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas internet di rumah peneliti dikarenakan situasi pandemi COVID-19. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2021-Juli 2021.

### 3.3 Alat dan Bahan

Alat, bahan, serta laman yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1, 3.2, dan 3.3. Seluruh perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini bersifat gratis (*open source*). Berikut adalah informasi alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

Tabel 3.1. Perangkat yang digunakan

No	Alat	Spesifikasi	Jumlah	Referensi
1.	Komputer HP 14s-cf3020TX	CPU Intel Core i5-1035G1, AMD Radeon 620 2GB, 14" FHD Brightview, 1TB HDD, 256GB SSD, 4GB DDR4-2666 + 8GB DDR4	1 unit	-
2.	Perangkat Lunak Open Babel GUI 2.4.1	Versi 2.4.1	1 unit	(O'Boyle dkk., 2011)
3.	Perangkat lunak Autodock Tools	Versi 4.2.6	1 unit	(Morris dkk., 2009)
4.	Perangkat Lunak Autodock Vina	Versi 1.1.2	1 unit	(Trott & Olson, 2010)

Tabel. 3.1. Perangkat yang digunakan (lanjutan)

No	Alat	Spesifikasi	Jumlah	Referensi
5.	Perangkat Lunak PyMOL	Versi 2.4.0	1 unit	(Schrödinger, 2015)
6.	Perangkat Lunak BIOVIA Discovery Studio 2020	Versi 20.1.0	1 unit	(Alazmi & Motwalli, 2020)
7.	Perangkat Lunak USCF Chimera	Versi 1.14	1 unit	(Pettersen dkk., 2004)
8.	Perangkat Lunak Swiss PDB Viewer	Versi 4.1.0	1 unit	(Schwede dkk., 2003)
9.	Perangkat Lunak Google Chrome	Versi 87.0.4280.88	1 unit	-

Tabel 3.2. Bahan yang digunakan

No	Bahan	Jenis	Spesifikasi	Jumlah
1.	Data struktur 3D Cholic Acid	Ligan	.SDF	1 unit
2.	Data struktur 3D Deoxycholic Acid	Ligan	.SDF	1 unit
3.	Data struktur 3D Lithochol-11-Enic Acid	Ligan	.SDF	1 unit
4.	Data struktur 3D Iloprost	Ligan	.SDF	1 unit
5.	Data struktur 3D Tetrahydrodeoxycorticosterone	Ligan	.SDF	1 unit
6.	Data struktur 3D Testosterone	Ligan	.SDF	1 unit
7.	Data struktur 3D Taurocholic Acid	Ligan	.SDF	1 unit
8.	Data struktur 3D Uridine-5-Monophosphate	Ligan	.SDF	1 unit
9.	Data struktur 3D Cholesteryl Sulfate	Ligan	.SDF	1 unit
10.	Protein <i>Main protease SARS-CoV-2</i>	Protein	.PDB; hasil kristalografi (PDB ID: 6W63)	1 unit
11.	Protein <i>Receptor Binding Domain SARS-CoV-2</i>	Protein	.PDB; hasil kristalografi (PDB ID: 6M0J; Chain E)	1 unit

Tabel 3.2. Bahan yang digunakan (lanjutan)

No	Bahan	Jenis	Spesifikasi	Jumlah
12.	Data struktur 3D <i>Angiotensin-converting Enzyme 2</i> (ACE2)	Protein	.PDB; hasil kristalografi (PDB ID: 6M0J; Chain A)	1 unit

Tabel 3.3. Laman unduh perangkat lunak, reseptor, dan ligan yang digunakan

No	Nama	Laman
1.	Open Babel	<a href="http://openbabel.org">http://openbabel.org</a>
2.	AutoDock Tools	<a href="http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/">http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/</a>
3.	AutoDock Vina	<a href="http://vina.scripps.edu/download.html">http://vina.scripps.edu/download.html</a>
4.	PyMOL	<a href="https://pymol.org/2/">https://pymol.org/2/</a>
5.	Biovia Discovery Studio	<a href="https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download">https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download</a>
6.	UCSF Chimera	<a href="https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html">https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html</a>
7.	Swiss PDB Viewer	<a href="https://spdbv.vital-it.ch/download_prerelease.html">https://spdbv.vital-it.ch/download_prerelease.html</a>
8.	Google Chrome	<a href="https://www.google.com/chrome/">https://www.google.com/chrome/</a>
9.	RCSB PDB	<a href="https://www.rcsb.org/search">https://www.rcsb.org/search</a>
10.	PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
11.	PASS ONLINE	<a href="http://www.way2drug.com/PASSOnline/">http://www.way2drug.com/PASSOnline/</a>

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi Sampel Ligan

Ligan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa yang didapatkan berdasarkan hasil analisis metabolomik tidak tertarget daging ikan sidat tahap *silver eel* dengan usia 12-13 bulan. Analisis metabolomik menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (UPLC-MS) dilakukan oleh Lembaga Apical Scientific Sdn Bhd dan diperoleh 935 senyawa, metabolit primer maupun sekunder, yang terkandung pada daging ikan sidat. Sebanyak 935 senyawa tersebut dibedakan berdasarkan metabolit primer dan sekunder yang dilakukan oleh Lembaga INBIO Indonesia dan didapatkan 629 senyawa yang termasuk metabolit sekunder. Sebanyak 629 senyawa metabolit sekunder dibagi menjadi dua secara acak, masing-masing berjumlah 314 dan 315 senyawa. Sebanyak 314 senyawa di analisis oleh Hasna Shalihah Ash Shiddiqiyah dan 315 senyawa di analisis oleh Putu Chandra Swandewi. Uraian alat, bahan serta tahap

pengerjaan terdapat pada Lampiran 6. Sebanyak 315 senyawa tersebut kemudian dicari potensi aktivitas biologisnya.

### 3.4.2 Struktur Ligan

Struktur tiga dimensi ligan yang digunakan diunduh dengan format .sdf dari Pubchem yang dapat diakses pada laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (Kim dkk., 2016). Senyawa ligan dengan format .sdf diubah menjadi format .pdb menggunakan Open Babel GUI versi 2.4.1 yang diunduh dari laman <http://openbabel.org> (Coumar, 2021). Senyawa-senyawa tersebut kemudian dilihat potensi aktivitas biologis sebagai antiviral menggunakan *web server* PASS Online yang dapat diakses pada laman <http://way2drug.com/PassOnline/>. Data senyawa ligan yang digunakan dalam penambatan molekuler adalah Cholic Acid (Pubchem CID: 221493), Deoxycholic Acid (Pubchem CID: 222528), Lithochol-11-Enic Acid (Pubchem CID: 5283972), Iloprost (Pubchem CID: 5311181), Tetrahydrodeoxycorticosterone (Pubchem CID: 101771), Testosterone (Pubchem CID: 6013), Taurocholic Acid (Pubchem CID: 6675), Uridine-5-Monophosphate (Pubchem CID: 1172).

### 3.4.3 Struktur Reseptor

Struktur reseptor atau protein diambil dari RCSB PDB yang dapat diakses pada laman <https://www.rcsb.org/search>. Terdapat tiga reseptor atau makromolekul (protein) yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu. (1) *Main protease* ( $M^{pro}$  atau sering dikenal dengan istilah 3C-like protease-3CL $^{pro}$ ) SARS-CoV-2 dengan inhibitor X77 (PDB ID: 6W63); (2) *Receptor Binding Domain* (RBD) SARS-CoV-2 (PDB ID: 6M0J; Chain E); dan (3) reseptor yang berperan dalam pengikatan SARS-CoV-2 pada sel manusia yaitu *Angiotensin-converting Enzyme 2* (ACE2) (PDB ID: 6M0J, rantai A).

### 3.4.4 Preparasi Ligan

Preparasi ligan uji meliputi pengubahan format .sdf menjadi format .pdb menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI. Preparasi ligan asli (*native ligand* atau inhibitor) dilakukan dengan memisahkan ligan asli yang terdapat pada kristalisasi kompleks protein. Hidrogen polar dan muatan Gasteiger ditambahkan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Struktur yang sudah dipreparasi di simpan dalam format .pdb untuk dilakukan minimisasi energi. Titik rotasi

ditentukan setelah dilakukan minimisasi energi dan ditentukan menggunakan AutoDock Tools dengan mengklik *Torsion tree>Choose Torsions>Set Number of Torsions*. Hasil ligan yang sudah dipreparasi disimpan dengan format .pdbqt.

### 3.4.5 Preparasi Reseptor

Preparasi reseptor dilakukan dengan menghapus ligan asli dan molekul air yang terdapat pada kompleks kristalisasi protein menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Hidrogen polar dan muatan Kollman ditambahkan pada struktur protein. Struktur yang sudah dipreparasi di simpan dalam format .pdb untuk dilakukan minimisasi energi.

Struktur protein yang sudah dilakukan minimisasi energi, di simpan dalam format .pdbqt menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Penyimpanan struktur protein mejadi .pdbqt dengan mengklik *Grid>Molecules>Choose>Pilih struktur protein yang akan digunakan>Select Molecule>Klik OK>Save* dan file reseptor akan tersimpan dalam bentuk .pdbqt.

### 3.4.6 Minimisasi Energi

Minimisasi energi dilakukan baik untuk senyawa ligan maupun struktur reseptor yang sudah preparasi. Minimisasi senyawa ligan uji dan ligan asli dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak UCSF Chimera. Minimisasi senyawa protein dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Swiss PDB Viewer (SPDBV). Struktur reseptor maupun ligan diubah dari format .pdb menjadi format .pdbqt menggunakan perangkat lunak Autodock Tools.

### 3.4.7 Preparasi Penambatan

Struktur reseptor dan ligan yang sudah dipreparasi dan minimisasi energi dilakukan pengubahan format .pdb menjadi format .pdbqt. Tahap ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Penentuan lokasi sisi penambatan dilakukan setelah format ligan dan protein menjadi.pdbqt,. Sisi penambatan ini disesuaikan dengan posisi ligan asli struktur protein dengan mengklik *Grid>Set Map Types>Choose Ligand*, lalu *Grid Box>Center>Center on Ligand*. Sisi penambatan pada reseptor yang tidak memiliki ligan asli ditentukan dengan menggunakan situs aktif protein tersebut. Sisi penambatan untuk setiap reseptor terdapat pada Tabel 3.4. Data konfigurasi antara struktur reseptor dan ligan yang telah dipreparasi disimpan dalam format .txt.

Tabel 3.4. Ukuran sisi penambatan (*grid box*) protein

Protein	Sisi Penambatan ( <i>grid box</i> )					
	Center (Å)			Size (Å)		
	X	Y	Z	X	Y	Z
M <sup>pro</sup> SARS-CoV-2	-19.340	18.376	-27.228	18	18	18
RBD SARS-CoV-2	-36.588	28.757	3.603	24	40	24
ACE2	-34.607	31.063	-3.383	20	40	20

### 3.4.8 Validasi Penambatan

Ligan asli hasil kristalografi yang terdapat pada situs aktif protein dilakukan preparasi, minimisasi energi, dan penambatan ulang. Ligan asli hasil kristalografi dibandingkan dengan ligan asli hasil penambatan molekuler menggunakan perangkat lunak PyMOL. Validasi penambatan ini dilakukan sebelum dilakukannya penambatan molekuler pada struktur reseptor yang memiliki ligan asli. Nilai *root mean square deviation* (RMSD) yang dihasilkan harus  $<2\text{\AA}$ . Validasi ini bertujuan untuk mengetahui ukuran dan koordinat sisi penambatan yang sesuai dengan situs aktif protein. Kalkulasi perhitungan nilai RMSD menggunakan perangkat lunak PyMOL dengan memberikan perintah “rms\_cur 6w63\_X77minimisasi, out1-6w63validasi\_ligand\_1”.

### 3.4.9 Penambatan Molekuler/ *Molecular Docking*

Proses penambatan molekuler dilakukan dengan AutoDock Vina menggunakan data konfigurasi yang sudah disiapkan dalam format .txt. Data konfigurasi terdiri dari reseptor, ligan, *center\_x*, *center\_y*, *center\_z*, *size\_x*, *size\_y*, *size\_z*, *log*, *number modes*, dan *exhaustiveness*. Hasil penambatan molekuler akan keluar dalam bentuk energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) atau afinitas ikatan yang muncul pada *command prompt* AutoDock Vina. Perintah yang digunakan pada *command prompt* adalah `vina.exe -config (namakonfigurasi).txt -log (namalog).txt -out (namaout).pdbqt -cpu 8`. Data pose ligan dengan nilai RMSD terkecil kemudian disimpan dalam format .pdbqt.

### 3.4.10 Visualisasi Hasil Penambatan

Hasil dari penambatan molekuler dilihat berdasarkan hasil yang keluar pada *command prompt* Autodock Vina dalam bentuk histogram. Histogram ini

menunjukkan afinitas energi ikatan (*binding affinity*) paling negatif pada setiap hasil penambatan. Parameter yang diamati saat penentuan afinitas pengikatan ligan adalah energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ), , residu asam amino, dan jumlah ikatan hidrogen. Semakin negatif nilai  $\Delta G$  menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi.

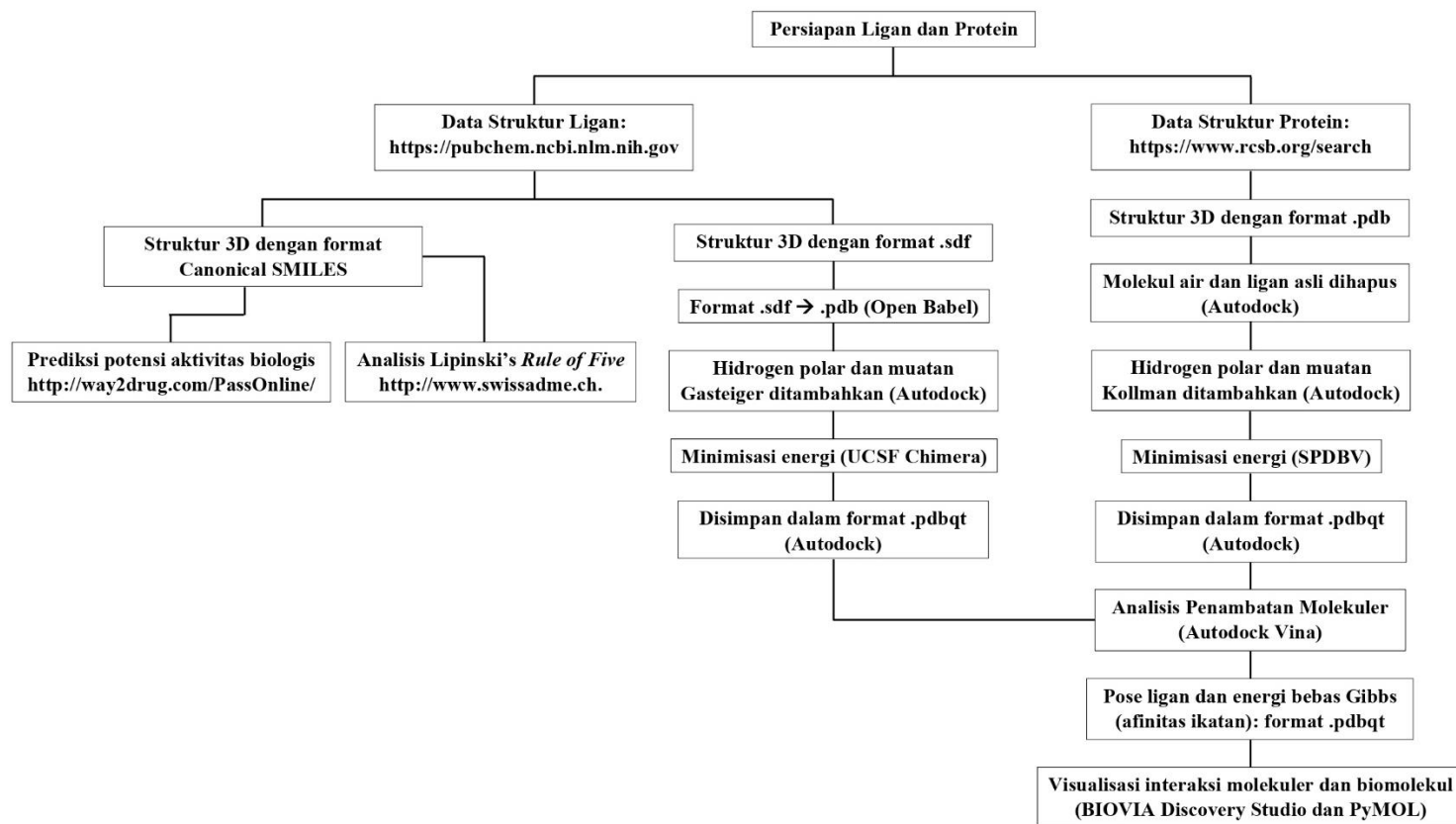
Hasil penambatan molekuler divisualisasikan menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020 dengan melihat interaksi molekuler yang terjadi. Interaksi molekuler adalah letak ligan uji pada rongga pengikatan (*binding pocket*) reseptor dan ikatan yang terbentuk antara reseptor dengan metabolit sekunder daging ikan sidat yang berperan sebagai ligan uji.

#### **3.4.11 Lipinski's Rule of Five**

Suatu senyawa dapat dikatakan efektif dan aman apabila memiliki potensi tinggi, afinitas, selektivitas terhadap target molekuler serta memiliki kemampuan dalam Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET). Salah satu cara analisis ADMET ini dengan menggunakan Lipinski's *Rule of Five*. Penentuan ADMET dengan memasukkan SMILES dari senyawa ligan yang terdapat pada PubChem ke *web server* SwissADME yang dapat diakses melalui laman <http://www.swissadme.ch>.

### 3.4.12 Alur Kerja

Alur kerja disusun berdasarkan prosedur penelitian. Bagan alir kerja terdapat pada Gambar 3.1.

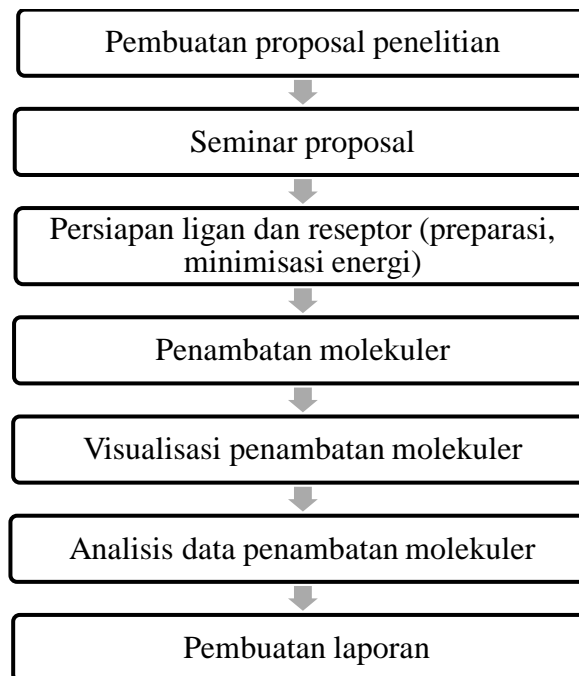


Gambar 3.1. Alur kerja



### 3.4.13 Alur Penelitian

Alur penelitian disusun berdasarkan alur penelitian yang dilakukan. Bagan alir penelitian terdapat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Alur penelitian